



UNIVERSIDAD DE LA RIOJA

TRABAJO FIN DE ESTUDIOS

Título

Origen molecular de la variación somática en la forma de la baya en la variedad de vid Prieto Picudo

Autor/es

JUAN SANZ GONZÁLEZ

Director/es

JOSÉ MIGUEL MARTÍNEZ ZAPATER , CARMEN TENORIO RODRÍGUEZ y
CAROLINA ROYO BRUN ,

Facultad

Escuela de Máster y Doctorado de la Universidad de La Rioja

Titulación

Máster Universitario en Química y Biotecnología

Departamento

AGRICULTURA Y ALIMENTACIÓN

Curso académico

2017-18



Origen molecular de la variación somática en la forma de la baya en la variedad de vid Prieto Picudo, de JUAN SANZ GONZÁLEZ

(publicada por la Universidad de La Rioja) se difunde bajo una Licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 3.0 Unported.

Permisos que vayan más allá de lo cubierto por esta licencia pueden solicitarse a los titulares del copyright.

© El autor, 2018

© Universidad de La Rioja, 2018

publicaciones.unirioja.es

E-mail: publicaciones@unirioja.es

ANÁLISIS DEL ORIGEN MOLECULAR DE LA VARIACIÓN SOMÁTICA EN LA FORMA DE LA BAYA EN LA VARIEDAD DE VID PRIETO PICUDO

Alumno: Juan Sanz González

Tutores: Carolina Royo Brun, Carmen Tenorio
Rodríguez, José Miguel Martínez Zapater



**UNIVERSIDAD
DE LA RIOJA**

**MÁSTER EN QUÍMICA
Y BIOTECNOLOGÍA**

CURSO 2017/2018

INDICE

RESUMEN.....

ABSTRACT.....

1. INTRODUCCIÓN.....	pag.1
1.1 La vid.....	pag.1
1.2 Genética de la vid.....	pag.1
1.3 La variedad Prieto Picudo Oval.....	pag.4
1.4 La variante Prieto Picudo Oval.....	pag. 5
1.5 Estudios Previos con Prieto Picudo.....	pag.6
2. OBJETIVOS.....	pag.7
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	pag. 8
3.1 Material Vegetal.....	pag.8
3.2 Extracción de DNA.....	pag.8
3.3 Diseño de oligonucleótidos.....	pag.9
3.4 Secuenciación y análisis de secuencias.....	pag.9
3.5 Familia génica.....	pag.9
3.6 RT-qPCR.....	pag.10
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	pag.11
4.1 Secuenciación del gen <i>VIT_04s0069g00550</i>	pag.11
4.2 Familia Génica.....	pag.13
4.3 Análisis de homocigóticos en S1.....	pag.17
4.4 PCR a tiempo real.....	pag.20
5. CONCLUSIONES.....	pag.23
6. BIBLIOGRAFÍA.....	pag.24
ANEXOS.....	pag.28

RESUMEN

La variedad Prieto Picudo, tradicional de Castilla y León, presenta una variante somática, Prieto Picudo Oval, con bayas más ovaladas. En estudios previos se determinó que dichas diferencias se relacionan con un mayor número de divisiones celulares durante la morfogénesis pre-antesis del pistilo en la variante oval. Un experimento de RNA-seq identificó un gen candidato que podría ser responsable de la variación. Se trata del gen *VIT_04s0069g00550*, anotado como un receptor de glutamato, que presentó un único haplotipo expresado en la variante oval y ausencia de expresión en la variante normal, lo que sugiere que Prieto Picudo Oval puede albergar una mutación de desregulación en *cis* en este gen. En este trabajo se realizaron estudios moleculares con el objetivo general de averiguar si el gen puede relacionarse con la variación somática de Prieto Picudo Oval. En primer lugar, mediante secuenciación Sanger de amplicones obtenidos a partir de PCR de gDNA se determinó que ambos morfotipos de Prieto Picudo son heterocigóticos para la región del gen, lo que apoya la idea de la presencia de una mutación reguladora en uno de los alelos del gen en la variante oval que causaría su sobreexpresión. Se analizó la familia génica de receptores de glutamato en el genoma de referencia de la vid y se determinó que la sobreexpresión encontrada en el RNA-seq se relaciona con un alelo de *VIT_04s0069g00550* y no con otros miembros de la familia. Con el objetivo de secuenciar cada alelo por separado e identificar la mutación, se hizo un rastreo de poblaciones S1 procedentes de la autofecundación de cada morfotipo parental. La secuenciación de un amplicon determinó que todos los individuos S1 son heterocigóticos en la región. Esto indica que puede haber alelos deletéreos recesivos en cada una de las copias cromosómicas, lo que impidió completar la secuenciación de los alelos del gen. Por último, mediante estudios de expresión de RT-qPCR alelo-específica se probó que el alelo correspondiente al haplotipo identificado en el RNA-seq se expresa en la variante oval y no en la normal. En conjunto, los resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que una mutación en *cis* causa la sobreexpresión del gen del receptor de glutamato en la variante oval. Se requieren más análisis moleculares y funcionales para identificar la mutación y comprobar su papel en el alargamiento de la baya.

ABSTRACT

The grapevine cultivar Prieto Picudo, traditional from Castilla y León, presents a somatic variant, Prieto Picudo Oval, that develops more elliptic berries. In previous studies these differences were related with a greater number of cell divisions during the pre-anthesis morphogenesis of the pistil in the oval variant. An RNA-seq experiment identified a candidate gene that could be responsible of the variation, the gene VIT_04s0069g00550 annotated as a glutamate receptor, which presented a single haplotype expressed only in the oval variant. Accordingly, Prieto Picudo Oval could harbour a *cis*-acting misexpression mutation in that gene. In this study, molecular experiments were made to elucidate if the gene can be related with the somatic variation in Prieto Picudo Oval. Firstly, by Sanger sequencing of amplicons originated from PCR of gDNA, it was demonstrated that both morphotypes of Prieto Picudo are heterozygous for the candidate gene region, which supports the idea of the presence of a regulatory mutation in one of the alleles of the gene in the oval berry variant as the cause of its over-expression. The glutamate receptor family gene was analysed in the reference grapevine genome, which showed that the over-expression found in the RNA-seq is related with an allele of VIT_04s0069g00550 allele and not with another family member. Aimed at sequencing each allele separately and identifying the mutation, a screening for homozygous individuals in S1 self-fertilization progenies of each parental morphotype was conducted. The amplification of one amplicon determined that all S1 individuals were heterozygous in that region. That result suggests the presence of recessive deleterious alleles in each of the chromosomal copies, which prevented the complete sequencing of the alleles for the candidate gene. Finally, with an allele-specific RT-qPCR it was proved that the allele corresponding to the haplotype previously identified in the RNA-seq is expressed in the oval and not in the normal variant. Overall, the results obtained support the hypothesis of a *cis*-acting misexpression mutation as the cause of the over-expression of the glutamate receptor gene in the oval variant. Additional molecular and functional analyses are required to identify that mutation and to confirm its role in berry elongation.

1. INTRODUCCION

1.1 La vid

La vid es uno de los cultivos más extendidos a nivel mundial. Su desarrollo óptimo se produce en latitudes entre 50°-30° N y entre 40°-30° S, en zonas con inviernos fríos y húmedos y veranos calurosos y secos. Por ello los principales países productores son los que presentan un clima mediterráneo, aunque la vid está adaptada a un amplio rango de ambientes (Bouquet, 2011).

Los tres principales usos de la uva son la producción de vino, el consumo como uva de mesa y el procesamiento para uva pasa. En menor medida, también se usa para producir zumos, aceite y aplicaciones cosméticas. La elaboración de vino engloba aproximadamente el 50% de la producción mundial de uva, siendo claramente el uso más importante de esta fruta (*Organizacion intenacional de la viña y el vino (OIV)*, 2018).

La mayoría de las vides cultivadas corresponden a la especie *Vitis vinífera*, una especie leñosa, con tendencia trepadora, que desarrolla hojas alternas y zarcillos opuestos a las mismas. Las flores son pequeñas y regulares, y la especie es dioica (flores masculinas y femeninas), aunque la mayoría de las variedades que se cultivan son hermafroditas (Martínez de Toda, 1991).

1.2 Genética de la vid

El género *Vitis* está compuesto por 60 especies y algunos híbridos interespecíficos naturales. El género *Vitis* es diploide y se subdivide en dos subgéneros, *Euvitis* y *Muscadinia*, con diferentes características morfológicas, anatómicas y citológicas. El subgénerio *Euvitis*, al que pertenece *Vitis vinífera*, posee una dotación haploide de 19 cromosomas, mientras que el subgénero *Muscadinia*, que incluye *Vitis rotundifolia*, tiene 20 cromosomas. Esta conservación del número cromosómico básico permite la posibilidad de realizar cruces interespecíficos de los cuales se derivan híbridos fértiles en la mayoría de los casos (Bayer and Stevens, 2007)

Durante la domesticación de la especie se mantuvo la elevada heterocigosidad que presentaba la especie silvestre (dioica) ya que los individuos seleccionados se han propagado vegetativamente.

La viticultura mundial actual se basa en un número relativamente pequeño de variedades relacionadas entre sí con un alto grado de parentesco. No obstante, aunque en teoría todos los individuos de una misma variedad son clones provenientes de injertos de yemas de una planta madre, ocasionalmente se detectan diferencias fenotípicas entre ellos. Estas diferencias pueden deberse a una amplia variedad de causas, entre las que se pueden destacar las condiciones ambientales (suelo, clima, manejo del cultivo, estado fitosanitario) y las que se deben a una variación genética (como consecuencia de la aparición y acumulación de mutaciones somáticas que alteran ciertos caracteres).

Dicha variación genética puede resultar muy útil tanto para ser aprovechada en programas de mejora genética, seleccionando las variantes somáticas con caracteres mejorados, así como para llevar a cabo aproximaciones de genética directa al análisis génico funcional (Pelsy, 2010).

Esta variación genética entre clones puede originarse mediante varios mecanismos:

- **Cambios de ploidía:** Existen registros de algunos casos de tetraploidía, usadas para mejora genética de uva de mesa, y de aneuploidía. Aunque la aparición espontánea de estos mutantes es rara (Bouquet, 2011).
- **Mutaciones puntuales:** Se han identificado en clones de una misma variedad tanto polimorfismos de un nucleótido (SNPs) como inserciones/delecciones de un nucleótido (InDels), con una densidad de 1,6 y 5,1 por Mb, respectivamente entre los clones analizados (Carrier *et al.*, 2012).
- **Polimorfismos de inserción generados por elementos móviles:** la presencia de elementos transponibles está considerada como la causa más frecuente de polimorfismo en vid (Carrier *et al.*, 2012), habiéndose caracterizado ya en estudios de genómica funcional fenotípica (Fernandez *et al.*, 2010).
- **Recombinación ilegítima** entre secuencias parálogas que puede dar lugar a reorganizaciones cromosómicas (Pelsy, 2010). Con la llegada

de las nuevas herramientas genéticas y genómicas, como los recientes avances en secuenciación masiva, se ha abierto uno de los caminos con más potencial para explotar la variabilidad y las numerosas posibilidades que presenta *V. vinífera*.

Debido a las características propias de la especie, como la ya citada alta heterocigosidad y el largo ciclo reproductivo que presenta, las poblaciones más usadas en estudios genéticos y genómicos son F₁ obtenidos tanto por autofecundación como a partir de cruzamientos entre dos variedades (Duchêne *et al.*, 2009; Riaz *et al.*, 2011; Barba *et al.*, 2014).

En la actualidad, se dispone del genoma de alta calidad de diferentes variedades de vid, el genoma de Pinot Noir (Velasco *et al.*, 2007), el genoma de referencia procedente de una línea de Pinot Noir altamente homocigótica tras varias autofecundaciones (Jaillon *et al.*, 2007), y el genoma de Cabernet Sauvignon (Chin *et al.*, 2016). El tamaño del genoma es relativamente pequeño, alrededor de 475 MB y presenta un 30-40% de regiones altamente repetitivas, siendo los elementos transponibles muy abundantes. Mediante anotaciones automáticas se han predicho 30000 genes y a un elevado porcentaje de los mismos se les ha asignado una posible función molecular (Jaillon *et al.*, 2007; Velasco *et al.*, 2007; Canaguier *et al.*, 2017).

Actualmente, la manera más usada para poder identificar la variación genética es la re-secuenciación del genoma del individuo mediante secuenciación masiva. Al contar con un genoma de referencia el proceso bioinformático es más sencillo, permitiendo visualizar cada modificación a nivel de secuencia que se haya producido (Di Gaspero and Cattonaro, 2010). Este tipo de análisis se está llevando a cabo para identificar variaciones entre clones de la misma variedad (Gambino *et al.*, 2017), para identificar el origen molecular en variantes somáticos (Carbonell-Bejerano *et al.*, 2017) así como para establecer variaciones estructurales de mayor importancia entre grupos de germoplasma diferenciados (Di Genova *et al.*, 2014).

La disponibilidad de la secuencia del genoma de referencia de la vid ha permitido también el desarrollo de estrategias de análisis global de expresión génica. Esta información sobre expresión diferencial ha contribuido a la catalogación de genes y familias génicas que podrían participar en diversos procesos de desarrollo o de respuesta de las vides a determinadas condiciones

ambientales (Fortes *et al.*, 2011; Lijavetzky *et al.*, 2012; Díaz-Riquelme, Martínez-Zapater and Carmona, 2014). Estas herramientas transcriptómicas también han permitido la identificación de genes cuya expresión está desregulada entre variantes somáticas de la misma variedad de vid y han llevado a la identificación de polimorfismos que se asocian a la desregulación y a la causa de variaciones fenotípicas entre clones (Fernandez *et al.*, 2010, 2013).

Los análisis transcriptómicos mediante secuenciación masiva (RNA-seq) proporcionan información tanto de la expresión como de la secuencia de cada transcrito, permitiendo la identificación de polimorfismos (SNPs/InDels) (Wolf, 2013) o de expresión alélica diferencial en genes heterocigóticos (Heap *et al.*, 2009). Estas técnicas también pueden ser útiles para el análisis de la variación entre clones porque permitirán la identificación de genes desregulados y de polimorfismos en secuencias codificantes que podrían relacionarse con la variación fenotípica.

1.3 La variedad Prieto Picudo

La variedad Prieto Picudo se ha cultivado históricamente en Castilla y León, en la zona comprendida por las comarcas de Valdevimbre, Los Oteros y las riberas del río Cela y del río Esla (Yuste, Peláez and Rubio, 1998). Actualmente, es una variedad principal de la Denominación de Origen Tierra de León, ubicada en el sureste de León, el norte de Valladolid y el noreste de Zamora (Rubio and Yuste, 2009).

Hasta hace algo más de una década su fama provenía de los vinos claretes con aguja característicos que se laboraban en la zona con la técnica del “madreado” que consiste en añadir bayas enteras o racimos enteros de Prieto picudo al final de la fermentación. Actualmente los elaboradores han ampliado la gama con la producción de vinos tintos que resultan aromáticos, color atractivo y con cualidades propias de pito picudo claramente distinguibles (Rubio and Yuste, 2009).

El origen de la variedad Prieto Picudo no se conoce con exactitud, ni se conoce ningún otro lugar de cultivo apreciable fuera de las comarcas citadas anteriormente. Seguramente en la expansión del viñedo y el modo de cultivo tuvo

mucha influencia el camino de Santiago y el mantenimiento de los monasterios (Rubio and Yuste, 2009).

Análisis genéticos indican que esta variedad comparte el 50% de alelos en veinte loci de microsatélites con la variedad Traminer (sinonimia de Savagnin) y con otras variedades de la zona (Lacombe *et al.*, 2013). Lo que está de acuerdo con que pueda derivar de variedades importadas del centro de Europa por las órdenes monacales del cister que se establecieron a lo largo del camino de Santiago (De Lempis, 1967).

La evolución del material vegetal de esta variedad ha tenido como consecuencia el desarrollo de diversas poblaciones de Prieto Picudo y por ser ligeramente diferentes entre sí, como por ejemplo el caso del denominado Prieto Picudo Oval, del que se hablará a continuación.

1.4 La variante Prieto Picudo Oval

Durante la selección y el estudio de cepas se observó la existencia de algunas plantas que presentaban ciertas características diferenciales, especialmente una forma oval de la baya más marcada. Esta variante somática de Prieto Picudo se denominó Prieto Picudo Oval (PPO) y se analizaron numerosos caracteres ampelográficos y se enunciaron varias diferencias existentes entre la nueva variante somática y la variedad de referencia, Prieto Picudo Normal (PPN) (Rubio and Yuste, 2009). A nivel molecular, se analizaron seis microsatélites que no identificaron diferencias entre Prieto Picudo y su variante oval (Arranz *et al.*, 2007). Las diferencias más destacables son la forma de la baya, siendo más oval la baya de PPO. Así mismo, el peso medio de la pepita también se estimó más elevado en bayas ovales que en bayas normales.

Puesto que todas las cepas de Prieto Picudo proceden, en principio, de la propagación vegetativa de una misma planta generada a partir de una semilla originada por reproducción sexual, deben compartir la mayoría de su material genético. Las diferencias fenotípicas entre las variantes de Prieto Picudo pueden deberse por tanto a la existencia de mutaciones somáticas que se han mantenido en algunas líneas a través de su reproducción vegetativa.

1.5 Estudios Previos con Prieto Picudo

Se realizó un estudio con el objetivo de identificar las diferencias morfológicas entre los morfotipos Normal y Oval de la variedad Prieto Picudo, así como identificar las posibles causas celulares y moleculares de esta variación (Pereira, 2014). Para ello, se analizaron tres clones del morfotipo oval (PPO1, PPO2, PPO3) y dos clones del morfotipo normal (PPN9 y PPN58).

Los resultados del estudio morfológico confirmaron de manera muy consistente la diferencia entre el morfotipo oval y el morfotipo normal a nivel de forma de la baya madura. Además, estos resultados indicaban que las diferencias de forma en la baya ya están establecidas en el cuajado y se mantienen a lo largo de todo el desarrollo y maduración de la baya.

Se concluyó que el síndrome de PPO deriva de un aumento en la longitud de los órganos reproductivos, incluyendo el estilo de la flor en antesis, el fruto a lo largo de todo su desarrollo, y la semilla.

Se realizó una comparación transcriptómica entre los morfotipos oval y normal de Prieto Picudo con el objetivo de hallar diferencias que pudieran estar relacionadas con las diferencias en el desarrollo de los pistilos/frutos entre los dos morfotipos. Se aplicó la metodología RNA-seq en muestras de flor (estadio H) de dos clones representativos de los dos morfotipos (PPO3 y PPN58). Se identificaron 52 genes expresados diferencialmente. Entre los genes sobreexpresados en el clon PPO3 el gen *VIT_04s0069g00550* presentó el mayor cambio en su nivel de expresión (57 veces más expresado en PPO3 que en PPN58). Este gen está anotado en el genoma de la vid como un receptor de glutamato (GLR), un canal iónico que presenta similitud con receptores del neurotransmisor glutamato de animales. La anotación de esta proteína se ha inferido por similitud con especies cercanas (Grimplet *et al.*, 2012). Los datos de RNAseq mostraron que los transcritos del gen *VIT_04s0069g00550* que se expresan en PPO3 corresponden a un único haplotipo. Dado que la vid es altamente heterocigótica, cabe suponer que Prieto Picudo también lo sea en este gen. Por tanto, se hipotetizó con la presencia de una mutación en *cis* en regiones reguladoras del gen asociada a la expresión específica de un alelo del gen (expresión alélica diferencial) en PPO. La sobreexpresión de solo un alelo podría ser suficiente para explicar el efecto dominante de la mutación en heterocigosis.

2 OBJETIVOS

1. Secuenciar el gen y la región reguladora del gen candidato *VIT_04s0069g00550* para determinar el estado de heterocigosidad e identificar posibles mutaciones de desregulación específicas de la variante oval.

2. Realizar un estudio de la familia génica de receptores de glutamato en el genoma de la vid para comprobar si el alelo sobreexpresado en Priteo Picudo Oval corresponde al locus del gen candidato.

3. Validar la sobreexpresión del alelo del gen candidato observada en estudios de RNA-seq anteriores mediante un estudio de expresión de RT-qPCR alelo-específica.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material Vegetal

En el ensayo se han estudiado dos clones que pertenecen a las variedades tintas Prieto Picudo “normal” (PPN58) y su variante somática Prieto Picudo Oval (PPO3), de un viñedo experimental establecido en la finca Zamadueñas (Valladolid) que pertenece al Instituto Tecnológico Agrario de Castilla y León (ITACyL).

Para la extracción del RNA utilizado para la síntesis de cDNA y el análisis por RTqPCR se utilizaron flores congeladas en estadio H que habían sido recogidas previamente (10-06-2013).

Para la obtención de individuos de autofecundación S1, en 2017 se embolsaron dos inflorescencias de cada clon para controlar la autopolinización y dos semanas después se desembolsaron. Al final de la maduración de las bayas, se extrajeron las semillas y se enviaron al ICVV. Allí, se sembraron 208 semillas de cada autofecundación de PPO3 y PPN58 y se guardaron a 4°C en oscuridad durante tres meses. Para la germinación y crecimiento de plántulas, las semillas sembradas en bandejas de 104 alveolos se pasaron a cámaras de cultivo a 25°C, 16 horas (aprox. 125 μ moles), 8 horas de oscuridad, con una humedad relativa de 80%.

Además, para la extracción de DNA total se utilizaron hojas jóvenes procedentes de las S1 de PPO3 y PPN58; de estaquillas de los parentales PPO3 y PPN58 del ITACyL que brotaron en cámara en el ICVV; y del genotipo homocigótico PN40024 (ESP217-5430) a partir del cual se produjo el genoma de referencia de la vid (Jaillon et al., 2007), y que en nuestro caso se obtuvo de la colección de variedades del ICVV en La Grajera.

3.2 Extracción de DNA

Las muestras de tejido vegetal fueron conservadas a -80°C antes de proceder a la extracción de DNA.

El DNA fue extraído con el kit de extracción DNeasy Plant Mini Kit siguiendo el protocolo standard sugerido por la empresa proveedora (*DNeasy Plant Mini Kit* - QIAGEN, 2016).

La concentración y pureza del DNA se midió utilizando un Nanodrop (Thermo Scientific) (Tabla X). El DNA extraído, así como las muestras de cDNA, se conservaron a -20°C.

3.3 Diseño de oligos

Se diseñaron oligonucleótidos tanto para completar la secuenciación del gen de interés *VIT_04s0069g00550* como para la obtención de cebadores alelo específicos para el desarrollo de la q-PCR.

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa Oligo Explorer (v1.1.2) en base a la secuencia de referencia del genoma de referencia 12X.0 y a los SNP's ya determinados en la variedad Prieto Picudo en anteriores proyectos (Pereira, 2014). La especificidad de las parejas de oligonucleótidos se comprobó por BLAST en Ensembl (http://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Tools/Blast?db=core;r=7:318001-328000) y NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>).

La síntesis de oligonucleótidos fue llevada a cabo por Sigma-Aldrich (Sigma-Aldrich Quimica SL, Madrid).

3.4 Secuenciación y análisis de secuencias

La secuenciación de los productos de PCR se llevó a cabo en la empresa STAB-Vida (Centro de testagem Molecular, Oporto) mediante el método Sanger con los oligonucleótidos utilizados en la amplificación. Las secuencias se alinearon con el software SeqScape (v2.6).

3.5 Familia génica

Se hizo un estudio de la familia génica del gen *VIT_04s0069g00550*. Mediante la página web UniProt (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) y Ensembl

(http://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Transcript/Summary?db=core;g=VIT_04s0069g00550;r=4:8484123-8488395;t=VIT_04s0069g00550.t01) se

identificaron los parálogos de la familia génica y se compararon entre ellos construyendo un árbol filogenético. Por lado, se realizó un estudio de los dominios funcionales de la proteína mediante una aplicación disponible en NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>).

3.6 RT-q-PCR

Las q-PCR se realizaron con el kit PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems) en placas de 96 pocillos (MicroAmp Optical 96-Well Reaction Plate) siguiendo las instrucciones sugeridas por el distribuidor.

La reacción y análisis de resultados se llevó a cabo con el equipo 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystem). Se analizaron parejas de primer diseñadas para la amplificación específica de transcritos de cada alelo del gen. Se analizaron muestras de cDNA de PPO3 y PPN58 y los valores se normalizaron frente a la amplificación de los alelos obtenida a partir de DNA genómico de las mismas muestras. Se analizaron tres réplicas técnicas por muestra.

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Secuenciación del gen *VIT_04s0069g00550* y comparación con la secuencia observada en resultados previos de RNA-seq

En primer lugar, se trató de completar la secuenciación de los alelos del gen *VIT_04s0069g00550* presentes en los morfotipos de Prieto Picudo analizando el clon de baya oval PPO3 y el clon de baya normal PPN58. Esta secuenciación se hizo con dos objetivos. Por un lado, se testó la presencia de SNPs en heterocigosis en regiones exónicas de PPO3 para tratar evaluar la presencia de dos alelos distintos del gen pese a que solo se encontrase un haplotipo expresado en PPO3 en el experimento de RNA-seq que se había realizado previamente. Por otro lado, se analizaron posibles regiones reguladoras del gen para tratar de identificar polimorfismos específicos de PPO3 que pudiesen causar la sobreexpresión. Para ello se diseñaron 14 cebadores que conformaban un total de 17 parejas (Figura 1). Tras testar todas las parejas, se obtuvo amplificación y se pudo secuenciar el producto de PCR obtenido con las parejas FJS005-RJS004 y FJS009-RJS004. Los cebadores FJS005 y FJS009 se diseñaron para amplificar desde las posiciones correspondientes a chr4:8483768 y chr4:8484016 en el genoma de referencia de la vid (Jaillon et al., 2007), aguas arriba del exón 1, hacia la región codificante del gen. En el intrón 1, se identificó una zona repetitiva de 12 x CT, desde la posición chr4:8484323, que impidió la correcta secuenciación de los amplicones a partir de ese punto. Desde el extremo 3' de los amplicones, la secuenciación con RJS004 fue satisfactoria, por lo que se consiguió ampliar la zona secuenciada correspondiente a 555 pares de bases (pb) del intrón 1 y 380 pb del exón 2. Sin embargo, con este cebador no se pudo definir la secuencia completa del amplicón debido a su gran longitud (1971 pb).

Muchas de las parejas de cebadores diseñadas no amplificaron. Estos resultados negativos se pueden deber a la variabilidad entre los genomas de Prieto Picudo y el de referencia, en el que se basa el diseño de cebadores, o a problemas de auto anillamiento de los cebadores no predichos por los programas utilizados para su diseño.

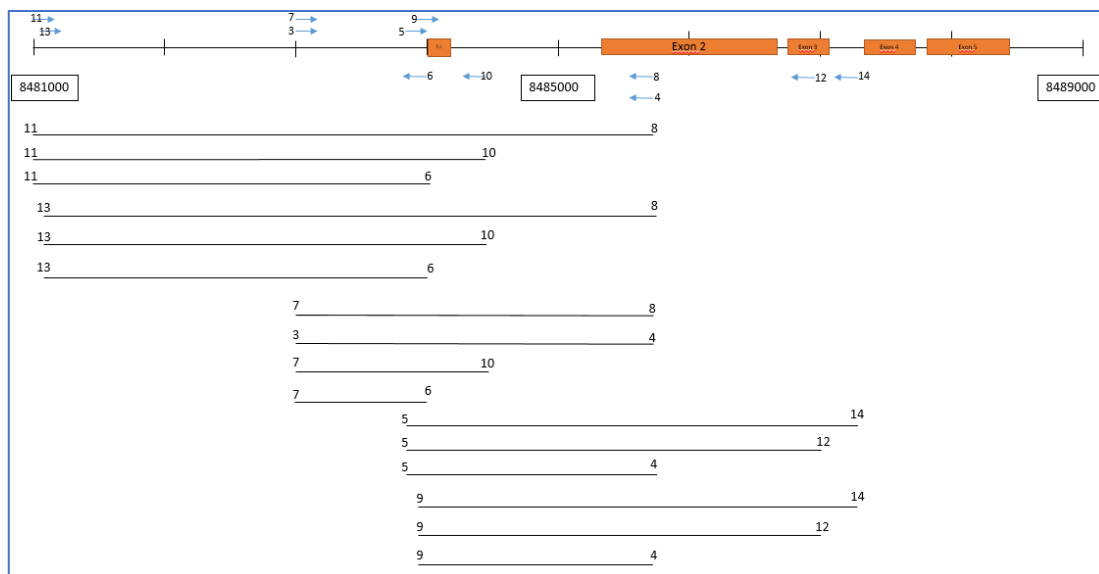


Figura 1: Ilustración de los oligonucleótidos diseñados para amplificar y secuenciar el gen VIT_04s0069g00550.

Para completar la caracterización de los alelos del gen en los dos morfotipos de Prieto Picudo estudiados, a las secuencias obtenidas en este trabajo hay que añadir los amplicones secuenciados en experimentos previos en el grupo, 1331 pb de la región reguladora aguas arriba del inicio de transcripción, la secuencia completa de los exones 1, 3 y 4 y la secuencia parcial del exón 2. En el estudio de estos segmentos secuenciados se identificaron polimorfismos tipo SNP tanto para las variedades Oval (PPO3) como para la normal (PPN58) respecto a PN40024, presentando ambas variedades los mismos polimorfismos (Figura 2). Según este resultado se concluye que tanto PPO como PPN presentan dos alelos distintos del gen *VIT_04s0069g00550*, con SNPs heterocigóticos en regiones exónicas del mismo

Para los SNPs identificados en regiones exónicas de *VIT_04s0069g00550* se realizó una comparación con la secuencia del haplotipo detectado en PPO en los datos previos de RNA-seq en este gen. Se observó que, en todas las posiciones analizadas, el segundo alelo identificado en la secuenciación de *VIT_04s0069g00550* en PPO y PPN coincide con el haplotipo identificado en PPO en los datos de RNA-seq (Tabla 1). De acuerdo con este resultado, el haplotipo único detectado en transcritos de PPO en los datos de RNA-seq debe corresponder a la sobreexpresión del segundo alelo de PPO y, por tanto, sí podría deberse a una mutación en regiones reguladoras de dicho alelo.

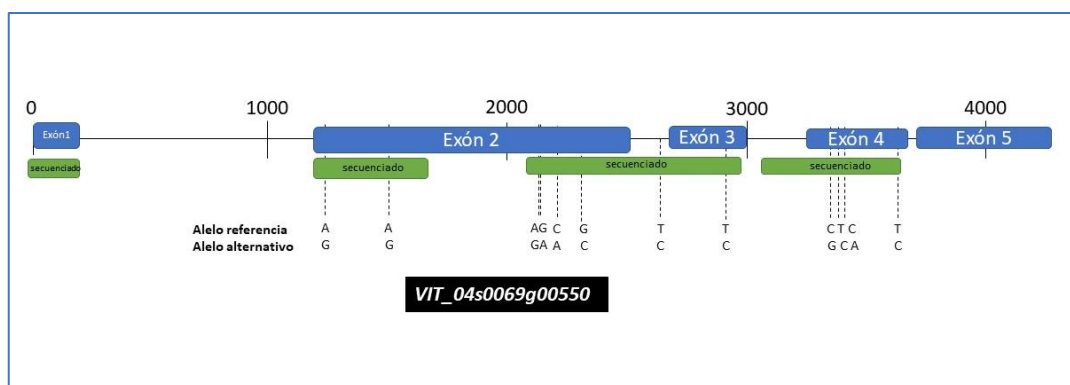


Figura 2: Gen **VIT_04s0069g00550** con los exones en azul y los segmentos secuenciados en verde. También se muestran las posiciones de los SNPs mostrando el alelo de referencia (PN40024) y el alelo alternativo que fue idéntico en ambos morfotipos (PPO, PPN)

Tabla 1: Comparación de los SNP identificados entre los dos alelos de **VIT_04s0069g00550** en PPO y PPN con el haplotipo identificado en PPO en el análisis de RNA-seq

Posición en el genoma de referencia	Alelo en el genoma de Referencia	Haplotipo de PPO3 en RNA-seq	Resultado de PCR y secuenciación Sanger				
			8PPO3C4	9PPN58C3	EQPPN58	EQPPO3	PN40024
chr4:8486254	G	A	GA	GA	GA	GA	G
chr4:8486341	C	A	CA	CA	CA	CA	C
chr4:8486411	G	C	GC	GC	GC	GC	G
chr4:8486819	T	C	TC	TC	TC	TC	T
chr4:8487035	T	C	TC	TC	TC	TC	T

4.2 Caracterización del producto del gen candidato y análisis de la familia génica

El transcrito de **VIT_04s0069g00550** consta de 5 exones. Tras el análisis de la proteína codificada por este gen en Ensembl (http://plants.ensembl.org/Vitis_vinifera/Transcript/Sequence_Protein?db=core;g=VIT_04s0069g00550;r=4:8484123-8488395;t=VIT_04s0069g00550.t01) se han anotado 29 dominios. Entre ellos se encuentran los ocho dominios principales característicos de proteínas de tipo receptor de glutamato que se

muestran en la Tabla 2, indicando la posición en la proteína y su posible función de receptor de glutamato o ligando. Este resultado indica que efectivamente el gen candidato puede codificar una proteína tipo receptor de glutamato.

Tabla 2: los 8 dominios del gen VIT_04s0069g00550

Dominio Fuente	Adhesión	aa inicio	aa terminación	Descripción
PIRSF	PIRSF037090	1	911	Receptor ionotrópico de glutamato
Superfamily	SSF53822	8	420	Proteína de unión periplásmica
CDD	cd06366	10	392	Dominio de unión a ligandos de receptores de GABAb
Pfam	PF01094	28	378	Receptor de unión por ligando
CDD	cd13686	428	777	Dominio de receptor de glutamato
Pfam	PF00497	456	779	Proteína de unión a solutos
Pfam	PF00060	557	810	Receptor ionotrópico de glutamato

El gen *VIT_04s0069g00550* tiene un total de 405 genes ortólogos en la base de datos de Ensembl y 19 genes parálogos pertenecientes a la familia génica de receptores de glutamato del genoma de la vid (Tabla 3). También se puede observar en el siguiente árbol filogenético (Figura 3) su parentesco con genes de receptor de glutamato de otras especies, y entre ellas, su similitud con dos homólogos de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Tabla 3: muestra los 19 genes parálogos del gen VIT_04s0069g00550 ordenados según su similitud con el mismo.

Taxonomía ancestral	Nombre del gen	Función	Localización	Similitud con el gen
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00170	Receptor de Glutamato	4:8,025,736-8,030,099:1	93.74 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00200	No caracterizado	4:8,105,891-8,107,997:1	83.22 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00670	Receptor de Glutamato	4:8,653,870-8,659,637:1	80.96 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00560	Receptor de Glutamato	4:8,508,975-8,513,037:1	80.69 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00260	No caracterizado	4:8,180,570-8,183,978:1	80.54 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00380	No caracterizado	4:8,358,445-8,360,989:1	80.24 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00010	Receptor de Glutamato	4:7,856,746-7,859,906:1	78.06 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00540	No caracterizado	4:8,473,898-8,478,265:-1	76.66 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00060	Receptor de Glutamato	4:7,892,040-7,897,638:1	75.38 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00230	No caracterizado	4:8,149,518-8,157,053:1	73.41 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00720	No caracterizado	4:8,723,240-8,727,233:1	72.36 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00390	Receptor de Glutamato	4:8,361,411-8,364,248:1	72.22 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00620	No caracterizado	4:8,600,289-8,620,211:1	67.58 %
Vitis vinifera	VIT_04s0069g00330	No caracterizado	4:8,256,197-8,269,048:1	42.33 %
Plantas con flores. Magnoliophyta	VIT_18s0122g00990	Receptor de Glutamato	18:696,948-703,801:-1	35.44 %
Plantas con flores. Magnoliophyta	VIT_12s0059g02270	Receptor de Glutamato	12:7,067,654-7,072,755:1	34.63 %
Plantas con flores. Magnoliophyta	VIT_03s0038g03920	Receptor de Glutamato	3:2,868,502-2,872,580:1	33.70 %
Plantas con flores. Magnoliophyta	VIT_07s0031g02170	Receptor de Glutamato	7:18,313,965-18,318,439:1	31.84 %
Plantas con flores. Magnoliophyta	VIT_12s0059g02260	Receptor de Glutamato	12:7,057,021-7,062,635:1	31.46 %

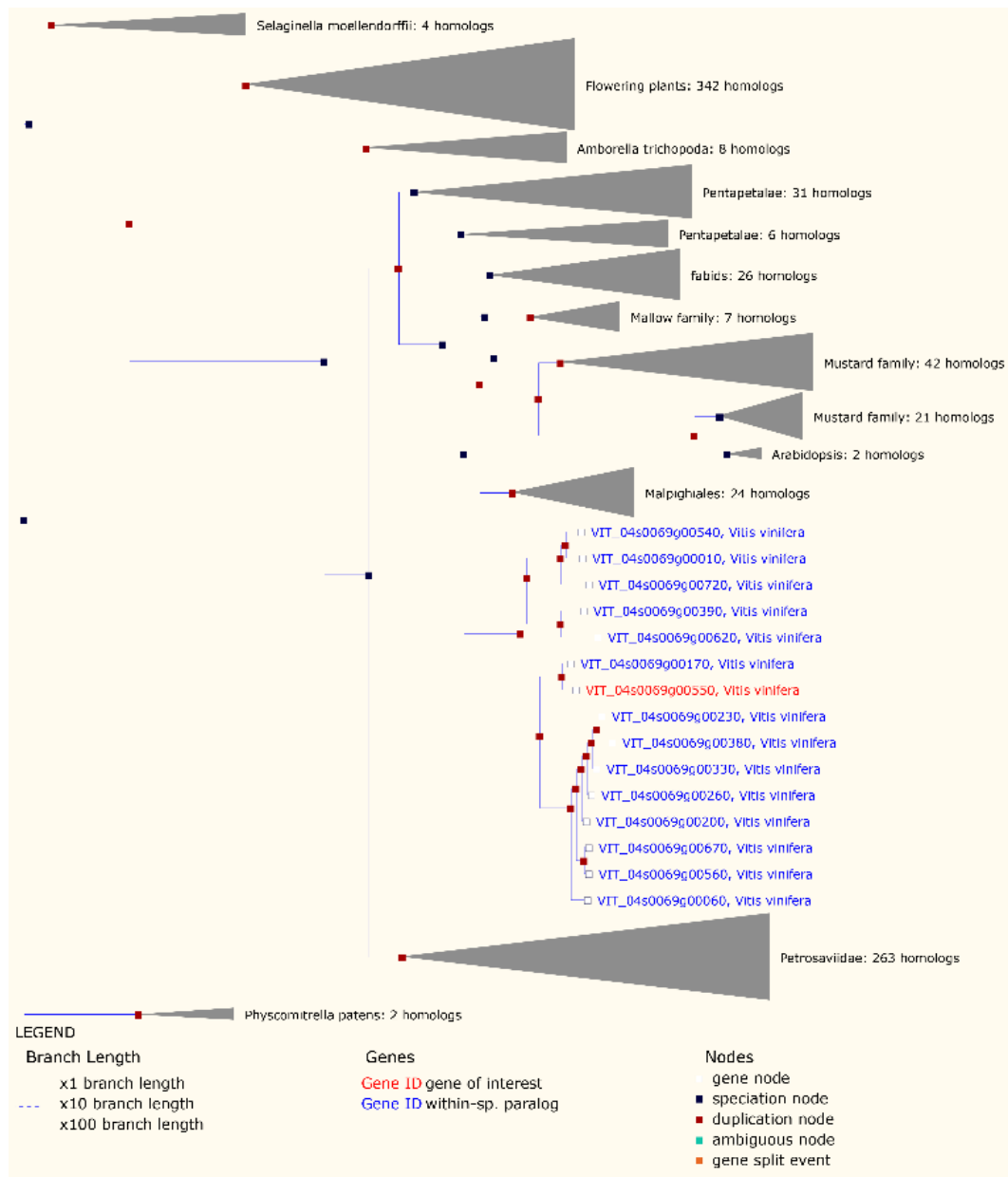


Figura 3: Árbol filogenético de la familia génica de receptores de glutamato

Debido a la alta cantidad de genes parálogos encontrados para el gen *VIT_04s0069g00550* y en algunos casos a su alto porcentaje de similitud con el gen de interés, fue necesario un estudio adicional para descartar la inespecificidad de los cebadores usados y la posible amplificación de algún otro gen. Se realizó entonces una comparación mediante SeqScape (v2.6) de los SNPs identificados en la secuenciación de nuestras amplificaciones con los SNP's conocidos para los genes parálogos según el genoma de referencia (PN40024). Se observó que los SNPs identificados al amplificar el gen

VIT_04s0069g00550 no coinciden con polimorfismos entre dicho gen y los otros miembros de la familia, con lo que se concluyó que los SNPs identificado son efectivamente polimorfismos entre los dos alelos del gen candidato (Figura 4).

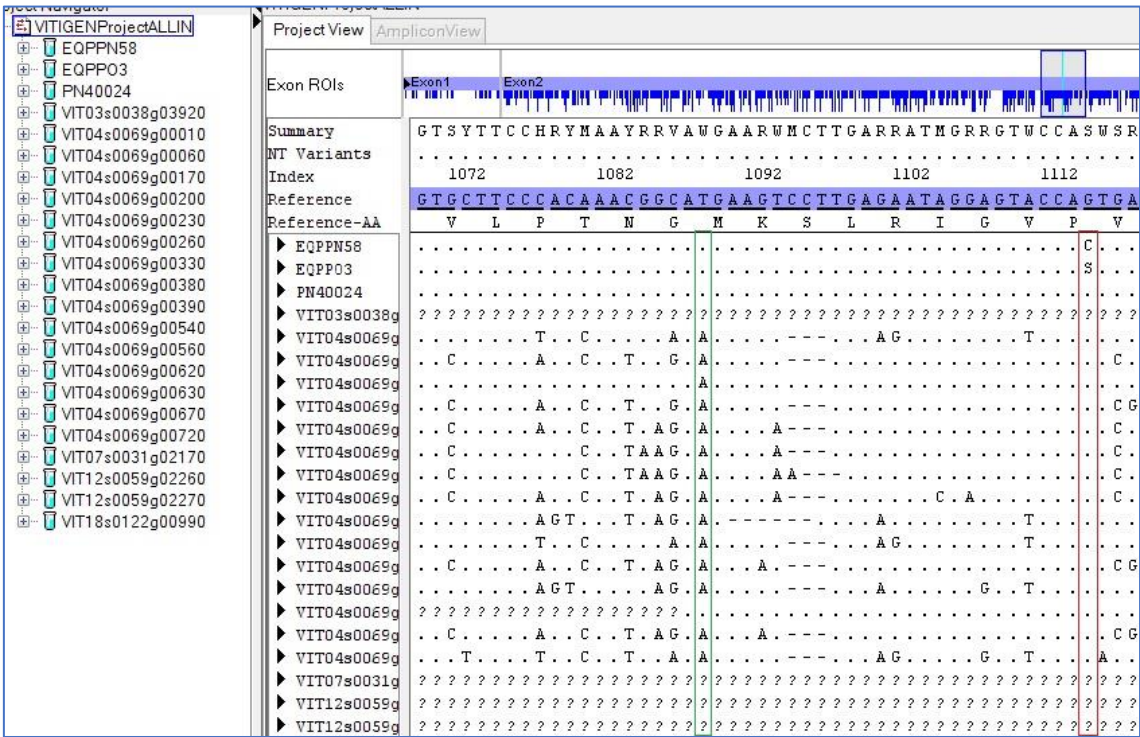


Figura 4: Ejemplo de comparación mediante SegScape de los SNPs identificados mediante PCR y secuenciación del gen VIT_04s0069g00550 en los parentales PPN58 y PPO3 (denominados EQPPN58 y EQPPO3) y en el genotipo de referencia PN40024 frente a la secuencia del genoma de referencia de la vid en las posiciones homólogas de los genes parálogos de VIT_04s0069g00550. Remarcado con color verde se puede ver un caso de presencia del polimorfismo (A/T) en los genes parálogos mientras que nuestro gen de estudio se mantiene igual al de referencia y remarcado en rojo el caso contrario, presencia de un SNP G/C en el gen VIT_04s0069g00550 mientras que en los parálogos se mantiene igual al de referencia.

4.3 Búsqueda de individuos de autofecundación S1 de PPO y PPN para la identificación de individuos homocigóticos

Con el objetivo poder secuenciar los alelos del gen candidato *VIT_04s0069g00550* en regiones reguladoras para tratar de identificar la mutación responsable, se analizaron plantas de la autofecundación de PPO3 y PPN58 en busca de individuos homocigotos para cada alelo. El índice de germinación de las semillas obtenidas tras la autofecundación fue del 22,6% para PPO3 y 26% para PPN58. Para buscar los individuos homocigóticos, se seleccionaron 15 individuos la S1 de cada parental para analizar la secuencia de una región de 960 pb desde la posición 956 del exón 2 a la posición hasta el final del exón 3 obtenida con los cebadores 400 y 401 (Anexo, tabla 8). En esta secuencia se identificaron 10 SNPs en PPO3 y PPN58, 3 en el exón 2 (R, M S en las posiciones 956, 1040 y 1113 del exón 2), 5 en el intrón 2 y 2 en el exón 3 (Y en las posiciones 27 y 243 del exón 3), iguales en ambas variantes. El análisis reveló que toda la población S1 analizada era heterocigota como los parentales para estos 10 polimorfismos del gen *VIT_04s0069g00550*. Como control de homocigosidad de las amplificaciones se analizó la línea PN40024 para la que sí se amplificó solo el alelo de referencia esperado, lo cual indica que efectivamente todos los individuos S1 analizados son heterocigóticos y no se estaría dando una segregación mendeliana de los alelos de *VIT_04s0069g00550*.

Al no encontrar ningún individuo homocigoto entre los S1 analizados se planteó la hipótesis de que hubiera un fallo en la segregación por la presencia de alelos deletéreos o letales recesivos en heterocigosis en cada una de las copias cromosómicas de PPO y PPN localizados en las proximidades del gen candidato. Para comprobar esta hipótesis, se planteó el análisis de la segregación en las progenies S1 de PPO y PPN de 8 marcadores tipo SNP localizados a lo largo del cromosoma 4. El análisis se hizo mediante dos chips de SNPs (Cabezas et al, 2011) procesados en el Servicio General de Genómica, Unidad de Secuenciación y Genotipado, SGIker (UPV/EHU) de la Universidad del País Vasco con el sistema Fluidigm (Tabla 4). Desafortunadamente, hasta esta fecha solo hemos recibido los resultados del

primer chip que tan solo contiene uno de los ocho marcadores SNP a analizar en el cromosoma 4. Se trata del SNP1399_81 que se encuentra a 13 Mb del gen candidato *VIT_04s0069g00550*, por lo que el ligamiento de la segregación entre ambos *loci* podría ser bajo. Tras un análisis Chi-cuadrado de la segregación de los alelos del SNP1399_81 estudiando independientemente la progenie S1 de cada variante de Prieto Picudo, se observó que no hay una diferencia estadísticamente significativa entre la segregación esperada para una segregación mendeliana ($\frac{1}{4}$ homocigotos AA, $\frac{1}{4}$ homocigotos GG, $\frac{1}{2}$ heterocigotos AG) y la observada ($p > 0,02$). Sin embargo, analizando la segregación de forma global en ambas progenies S1 (la de PPO más la de PPN) sí que se encuentran diferencias significativas ($p < 0,02$) (Tabla 5 y 6). Este resultado nos lleva a suponer que puede haber una segregación sesgada de la región cercana al gen que no se transmite a la descendencia.

Tabla 4: SNPs conocidos y localizados en el cromosoma 4.

	posición del SNP	gen	genotipo en Prieto Picudo
	chr4:1554984	VIT_04s0008g01950	AG
	chr4:1856385	VIT_04s0008g02250	AG
	chr4:6768962	VIT_04s0008g06770	CG
GLR2	chr4:8484123...8488395	VIT_04s0069g00550	
	chr4:17662173	VIT_04s0023g01250	AT
	chr4:19931134	VIT_04s0023g03370	AT
	chr4:20091919	VIT_04s0023g03550	CG
	chr4:21396400	VIT_04s0044g00560	AC
SNP1399_81	chr4:21849155	VIT_04s0044g00730	AG

Tabla 5: Genotipado del SNP1399_81 en S1 de PPO3 y PPN58.

PPO3	SNP1399_81	PPN58	SNP1399_81
1 PPO3 Cep3	A:G	1PPN58 Cep1	A:G
1PPO3 Cep 3	A:G	1PPN58 Cep3	A:G
1PPO3 Cep4	A:A	2PPN58 Cep1	G:G
2PPO3 Cep3	A:G	2PPN58 Cep3	A:G
2PPO3 Cep4	A:G	3PPN58 Cep1	G:G
3PPO3 Cep3	G:G	3PPN58 Cep3	A:G
3PPO3 Cep4	A:G	4PPN58 Cep1	A:G
4PPO3 Cep3	A:G	4PPN58 Cep3	G:G
4PPO3 Cep4	G:G	5PPN58 Cep1	A:A
7PPO3 Cep3	A:G	5PPN58 Cep3	A:G
7PPO3 Cep4	A:G	6PPN58 Cep1	A:G
8PPO3 Cep3	G:G	6PPN58 Cep3	A:G
8PPO3 Cep4	G:G	7PPN58 cep3	A:G
9PPO3 Cep4	G:G	8PPN58 cep3	A:A
10PPO3 Cep4	A:G	9PPN58 Cep3	A:G

Tabla 6: resultados de la Chi-cuadrado para los individuos S1, teniendo en cuenta las distintas variantes de prieto Picudo y a nivel global.

Prueba Chi-cuadrado	valor	gl	p
PPO3	2,73	2	0,26
PPN58	1,8	2	0,41
Global	22,6	2	1,23729E-05

Esta diferencia entre los resultados del estudio independiente de ambas variantes de Prieto Picudo y el estudio global se pueden deber posiblemente a que el tamaño muestral en el primer caso no es muy grande (n=15) y las frecuencias aparecidas son menores a 5, por lo que el estudio por Chi-cuadrado en ese caso no tiene un gran valor estadístico. Podrían ser más fiables por tanto los resultados del estudio global al tener un tamaño muestral y frecuencias superiores. A fecha de hoy aún no se han recibido datos de los otros SNPs estudiados. Cuando estén disponibles los datos adicionales de marcadores más próximos al gen candidato se podría hacer un estudio con mayor fidelidad, para determinar si existe algún individuo S1 homocigótico que pueda ser útiles en estudios de secuenciación futuros para tratar de identificar la mutación en regiones reguladoras del gen.

4.4 Validación de la sobreexpresión del alelo alternativo del gen candidato en PPO mediante PCR cuantitativa a tiempo real

Se realizó un experimento de PCR cuantitativa alelo-específica para comparar la expresión de los dos alelos identificados para el gen candidato del receptor de glutamato. Para la PCR a tiempo real alelo específica se diseñaron 12 cebadores cuyo extremo 3' coincide con posiciones SNP identificadas entre los alelos del gen candidato *VIT_04s0069g00550* en regiones exónicas. De este modo, en cada pareja de cebadores, el nucleótido del extremo 3' coincide con el nucleótido correspondiente a uno de los alelos (Figura 5). Además, el diseño de cebadores en la mitad de las parejas se realizó mediante la técnica de “mismatch (con nomenclatura QFJS-QRJS en la Figura 5). La técnica “mismatch” consiste en eliminar uno de los nucleótidos próximos al extremo 3' del cebador además de que el último nucleótido 3' coincida con el SNP para aumentar su especificidad (Gupta, Yates and Meibohm, 2005).

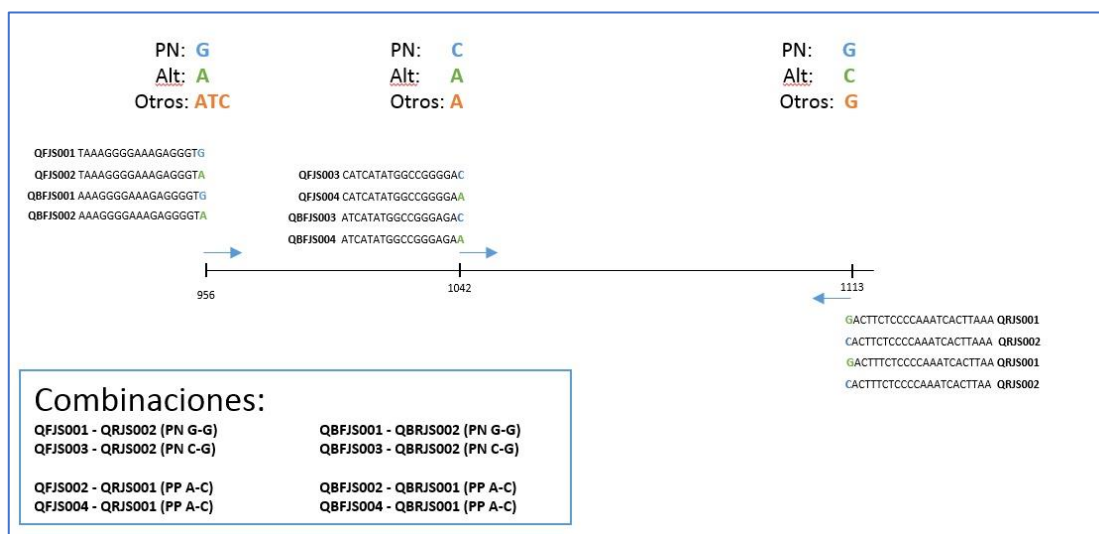


Figura 5: esquema de los oligonucleótidos diseñados para amplificar en las zonas que presentaban SNP's del exón 2 del gen *VIT_04s0069g00550*. En colores se puede distinguir los distintos SNP's para las diferentes variedades (en azul PN: PN40024, en verde Alt: alelo alternativo diferente a PN40024 y sobre expresado en RNAseq en PPO3, en naranja Otros: Otros SNP's en la misma posición pertenecientes a genes de la familia génica de *VIT_04s0069g00550*).

Además, se usaron dos parejas de cebadores (515-418, 516-418) (Anexo, tabla 8) previamente diseñadas en el laboratorio. Todas las parejas de cebadores se probaron en DNA genómico de PPO3 y PPN58 en un termociclador BioRad, con el kit para PCR. Fast Gene Taq ReadyMix PCR Kit, en las mismas condiciones que en la PCR a tiempo real (94°C 30 segundos, 60°C 1 minuto, 72°C 1 minuto). Los cebadores diseñados con la técnica “mismatch” no amplificaron ni en PPO3 ni en PPN58, por tanto, su uso se descartó para posteriores análisis.

Se realizó una PCR a tiempo real alelo-específica con los cebadores QBFJS001-QBRJS002 para el alelo de referencia y los cebadores QBFJS002-QBRJS001 para el alelo alternativo. Ambos alelos se analizaron sobre cDNA procedente de flores de estadio H en dos cepas diferentes de PPO3 y PPN58, y en DNA total de PPO3 y PPN58. Las mismas parejas de cebadores se utilizaron sobre gDNA de PPO3 y PPN58 para normalizar los valores de amplificación de cada alelo asumiendo que en el gDNA la relación entre ambos alelos es 1:1. El análisis de la expresión relativa del alelo alternativo, que se realizó con 7500 Software v2.0.1, confirma el resultado del RNA-seq, presentando expresión en PPO3 y no expresión en PPN58 (Figura 6).

El análisis del gDNA confirma que en esas condiciones los cebadores sí amplifican, pero no debe haber RNA mensajero del gen en PPN58. Sin embargo, la amplificación del alelo de referencia funcionó mal y la amplificación fue casi nula tanto sobre el gDNA de PPO3 como el de PPN58, por lo que la variabilidad entre réplicas fue muy alta y la comparación de la expresión génica de los dos alelos quedó desvirtuada en PPO3. Para confirmar el resultado sería conveniente repetir el análisis tras diseñar nuevos cebadores para el alelo de referencia del gen candidato que tengan mayor eficiencia de amplificación sobre gDNA.

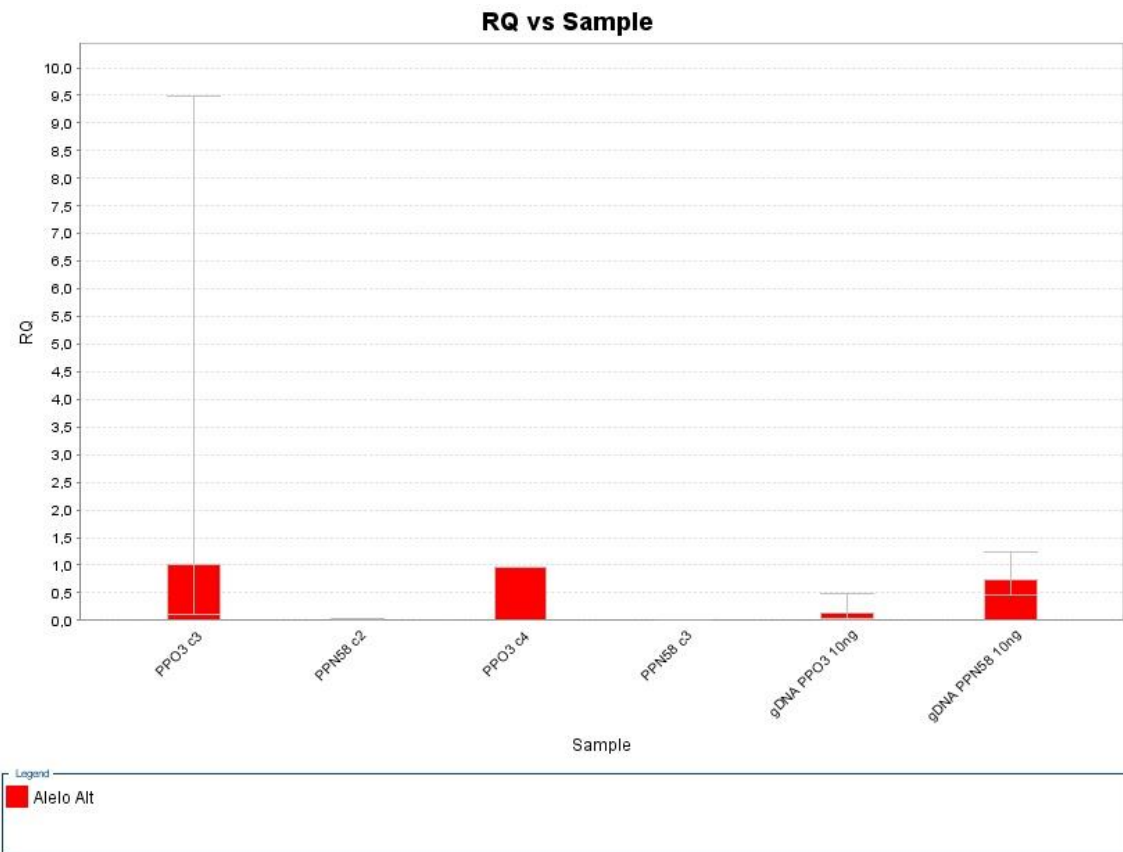


Figura 6: Expresión relativa del alelo alternativo respecto al alelo de referencia en las cepas 3 y 4 de PPO3 (PPO3 c3 y PPO3 c4) y las cepas 2 y 3 de PPN58 (PPN58 c2 y PP N58 c3).

5 CONCLUSIONES

1. Mediante estudios de PCR y secuenciación se determinó que el gen candidato *VIT_04s0069g00550* es heterocigótico en regiones exónicas de PPN y PPO.

2. Un análisis bioinformático de la secuencia del gen candidato *VIT_04s0069g00550* identificó que la proteína codificada por el mismo presenta los dominios característicos de proteínas tipo receptor de glutamato.

2. La comparación de datos de secuenciación de DNA genómico y de RNA-seq del gen candidato en PPO y de la secuencia de otros miembros de la familia de receptores de glutamato en el genoma de referencia de la vid confirmó que el haplotipo que se sobreexpresa en PPO corresponde a uno de los alelos del gen *VIT_04s0069g00550* y no a otros miembros de la familia génica. Esto apoya la presencia de una mutación en una región reguladora del gen *VIT_04s0069g00550* en el alelo de PPO que está sobre-expresado. En este trabajo no se pudo completar la búsqueda de la mutación responsable de la sobreexpresión en este alelo, por lo que se requieren más análisis moleculares y funcionales para identificarla y demostrar su relación con la alteración de la forma de la baya en PPO.

6 BIBLIOGRAFÍA

Arranz, C. *et al.* (2007) 'Variabilidad genotípica, fenotípica y cualitativa de la variedad tinta Prieto Picudo', *Vida rural*, 14(242), pp. 54–57.

Barba, P. *et al.* (2014) 'Grapevine powdery mildew resistance and susceptibility loci identified on a high-resolution SNP map', *Theoretical and applied genetics*. Springer, 127(1), pp. 73–84.

Bayer, C. and Stevens, P. F. (2007) *Flowering Plants. Eudicots: Berberidopsidales, Buxales, Crossosomatales, Fabales pp, Geraniales, Gunnerales, Myrtales pp, Proteales, Saxifragales, Vitales, Zygophyllales, Clusiaceae Alliance, Passifloraceae Alliance, Dilleniaceae, Huaceae, Picramniaceae*, . Springer Science & Business Media.

Bouquet, A. (2011) 'Grapevines and viticulture', *Genetics, Genomics, and Breeding of Grapes*, pp. 1–29.

Canaguier, A. *et al.* (2017) 'A new version of the grapevine reference genome assembly (12X. v2) and of its annotation (VCost. v3)', *Genomics data*. Elsevier, 14, p. 56.

Carbonell-Bejerano, P. *et al.* (2017) 'Catastrophic unbalanced genome rearrangements cause somatic loss of berry color in grapevine', *Plant physiology*. Am Soc Plant Biol, 175(2), pp. 786–801.

Carrier, G. *et al.* (2012) 'Transposable elements are a major cause of somatic polymorphism in *Vitis vinifera* L.', *PloS one*. Public Library of Science, 7(3), p. e32973.

Chin, C.-S. *et al.* (2016) 'Phased diploid genome assembly with single-molecule real-time sequencing', *Nature methods*. Nature Publishing Group, 13(12), p. 1050.

Díaz-Riquelme, J., Martínez-Zapater, J. M. and Carmona, M. J. (2014) 'Transcriptional analysis of tendril and inflorescence development in grapevine (*Vitis vinifera* L.)', *PLoS One*. Public Library of Science, 9(3), p. e92339.

DNeasy Plant Mini Kit - QIAGEN (2016). Available at:

<https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=6b9bcd96-d7d4-48a1-9838-58dbfb0e57d0&lang=en> (Accessed: 7 March 2018).

Duchêne, E. *et al.* (2009) 'A grapevine (*Vitis vinifera* L.) deoxy-D-xylulose synthase gene colocates with a major quantitative trait loci for terpenol content', *Theoretical and Applied Genetics*. Springer, 118(3), pp. 541–552.

Fernandez, L. *et al.* (2010) 'Transposon-induced gene activation as a mechanism generating cluster shape somatic variation in grapevine', *The Plant Journal*. Wiley Online Library, 61(4), pp. 545–557.

Fernandez, L. *et al.* (2013) 'Mis-expression of a PISTILLATA-like MADS box gene prevents fruit development in grapevine', *The Plant Journal*. Wiley Online Library, 73(6), pp. 918–928.

Fortes, A. M. *et al.* (2011) 'Transcript and metabolite analysis in Trincadeira cultivar reveals novel information regarding the dynamics of grape ripening', *BMC plant biology*. BioMed Central, 11(1), p. 149.

Gambino, G. *et al.* (2017) 'Whole-genome sequencing and SNV genotyping of "Nebbiolo" (*Vitis vinifera* L.) clones', *Scientific reports*. Nature Publishing Group, 7(1), p. 17294.

Di Gaspero, G. and Cattonaro, F. (2010) 'Application of genomics to grapevine improvement', *Australian Journal of Grape and Wine Research*. Wiley Online Library, 16(s1), pp. 122–130.

Di Genova, A. *et al.* (2014) 'Whole genome comparison between table and wine grapes reveals a comprehensive catalog of structural variants', *BMC plant biology*. BioMed Central, 14(1), p. 7.

Grimplet, J. *et al.* (2012) 'Comparative analysis of grapevine whole-genome gene predictions, functional annotation, categorization and integration of the predicted gene sequences', *BMC Research notes*. BioMed Central, 5(1), p. 213.

Gupta, M., Yates, C. R. and Meibohm, B. (2005) 'SYBR Green-based real-time PCR allelic discrimination assay for β 2-adrenergic receptor polymorphisms', *Analytical biochemistry*. Academic Press, 344(2), pp. 292–294.

Heap, G. A. *et al.* (2009) 'Genome-wide analysis of allelic expression

imbalance in human primary cells by high-throughput transcriptome resequencing', *Human molecular genetics*. Oxford University Press, 19(1), pp. 122–134.

Jaillon, O. *et al.* (2007) 'The grapevine genome sequence suggests ancestral hexaploidization in major angiosperm phyla', *nature*. Nature Publishing Group, 449(7161), p. 463.

Lacombe, T. *et al.* (2013) 'Large-scale parentage analysis in an extended set of grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.)', *Theoretical and applied genetics*. Springer, 126(2), pp. 401–414.

De Lempis, A. H. (1967) *Vignobles et vins du Nord-Ouest de l'Espagne...* Bellene.

Lijavetzky, D. *et al.* (2012) 'Berry flesh and skin ripening features in *Vitis vinifera* as assessed by transcriptional profiling', *PloS one*. Public Library of Science, 7(6), p. e39547.

Martínez de Toda, F. F. (1991) 'Biología de la vid, Fundamento Biológico de la Vid', *Ediciones Mandí Prensas. Madrid España*, pp. 51–52.

Organizacion intenacional de la viña y el vino (OIV) (2018). Available at: <http://www.oiv.int/en/oiv-life/table-and-dried-grapes-world-data-available>.

Pelsy, F. (2010) 'Molecular and cellular mechanisms of diversity within grapevine varieties', *Heredity*. Nature Publishing Group, 104(4), p. 331.

Pereira, L. (2014) 'Análisis fenotípico y molecular de la variante de fruto oval en la variedad de vid Prieto Picudo'.

Riaz, S. *et al.* (2011) 'Using a limited mapping strategy to identify major QTLs for resistance to grapevine powdery mildew (*Erysiphe necator*) and their use in marker-assisted breeding', *Theoretical and applied genetics*. Springer, 122(6), pp. 1059–1073.

Rubio, J. A. and Yuste, J. (2009) *Clones certificados de las principales variedades tradicionales de vid en Castilla y León*. ITACyL.

Velasco, R. *et al.* (2007) 'A high quality draft consensus sequence of the

genome of a heterozygous grapevine variety', *PloS one*. Public Library of Science, 2(12), p. e1326.

Wolf, J. B. W. (2013) 'Principles of transcriptome analysis and gene expression quantification: an RNA-seq tutorial', *Molecular ecology resources*. Wiley Online Library, 13(4), pp. 559–572.

Yuste, J., Peláez, H. and Rubio, J. A. (1998) 'LM Robredo. 1998. Selección clonal y Sanitaria de la vid en Castilla y León', *Agricultura*, (792), pp. 548–552.

7 ANEXOS

Tabla 7: Resultados de extracción de DNA

ID	Fecha	[DNA] µg/µL	260/280	260/230
PPO3 Cam7	15/02/2018	105,5	1,75	1,54
PPN 58 Cam7	15/02/2018	87,1	1,76	1,51
PPN 58 Cam7	15/02/2018	57,6	1,86	1,94
1PPO3 Cep 3	19/02/2018	27,5	1,72	1,34
2PPO3 Cep4	20/02/2018	48,5	1,73	1,27
4PPO3 Cep4	20/02/2018	93,6	1,71	1,42
3PPO3 Cep4	20/02/2018	28,7	1,59	0,6
2PPN58 Cep1	21/02/2018	49,2	1,73	0,95
1PPN58 Cep1	21/02/2018	34,6	1,58	0,54
1PPO3 Cep4	21/02/2018	17,8	1,78	1,19
7PPO3 Cep3	21/02/2018	42,9	1,74	1,2
2PPO3 Cep3	22/02/2018	31,4	1,62	0,78
3PPN58 Cep1	22/02/2018	24,8	1,53	0,63
4PPN58 Cep1	22/02/2018	24,5	1,55	0,5
5PPN58 Cep1	22/02/2018	39,3	1,7	0,9
6PPN58 Cep1	08/03/2018	65,3	1,77	1,64
1PPN58 Cep3	08/03/2018	50,6	1,68	0,83
2PPN58 Cep3	08/03/2018	69,5	1,73	1,08
3PPN58 Cep3	08/03/2018	43,1	1,54	0,45
5PPN58 Cep3	09/03/2018	42,4	1,69	0,81
4PPN58 Cep3	09/03/2018	56,6	1,72	0,95
6PPN58 Cep3	09/03/2018	43,1	1,69	0,65
7PPN58 cep3	09/03/2018	37,3	1,77	0,82
8PPN58 cep3	09/03/2018	63,5	1,65	1
9PPN58 Cep3	09/03/2018	72,1	1,73	1,34
3PPO3 Cep3	12/03/2018	44,6	1,72	0,95
8PPO3 Cep4	12/03/2018	69,7	1,64	0,56
9PPO3 Cep4	12/03/2018	32,4	1,76	1,49
10PPO3 Cep4	12/03/2018	61,1	1,7	0,97
4PPO3 Cep3	12/03/2018	67,4	1,72	1,04
7PPO3 Cep4	12/03/2018	30,1	1,48	0,51
8PPO3 Cep3	14/03/2018	18,9	1,7	0,73
1 PPO3 Cep3	14/03/2018	17,4	1,7	0,64
PN40024 P4	03/05/2018	120	1,72	1,3
PPN58 parental 1	06/06/2018	101,6	1,8	1,8
PPN58 parental 2	06/06/2018	122,2	1,8	1,78
PPO3 parental 1	06/06/2018	71	1,79	1,56
PPO3 parental 2	06/06/2018	79,3	1,8	1,56

Tabla 8: Oligonucleótidos utilizados

ID	Secuencia 5'-3'	Posición
FJS001	GACACAACGTGAAACCCA	Chr4:8483011
FJS003	AGAGTGACACAACGTGAAACC	Chr4:8483006
FJS005	CTAAGAGTGGGTCTGGCTCC	Chr4:8483768
FJS007	GAGTGACACAACGTGAAACCC	Chr4:8483007
FJS009	GAATCTTAAAGCGTCCCCAG	Chr4:8484016
FJS011	GTGGCTGGACGAAGATGATT	Chr4:8481081
FJS013	TGGTCCTGTCAGTGGCAATA	Chr4:8481107
RJS002	CAGATTCCGTGTAAGGCAG	Chr4:8486877
RJS004	GCCCAAGAGGTGTAGACATG	Chr4:8485739
RJS006	GCTAACCCGAATTTGTGCTG	Chr4:8483719
RJS008	TGGTATAACGCCATTCCCAT	Chr4:8485582
RJS010	TCCCTAGCCAGGTATCCATG	Chr4:8484193
RJS012	ATCTATGACGGGCACAATCA	Chr4:8486906
RJS014	AAGGTTCTGACAGCATGGAA	Chr4:8487201
QFJS001	TAAAGGGGAAAGAGGGTG	Chr4:8486255
QFJS002	TAAAGGGGAAAGAGGGTA	Chr4:8486255
QFJS003	CATCATATGGCCGGGGAC	Chr4:8486342
QFJS004	CATCATATGGCCGGGGAA	Chr4:8486342
QBFJS001	AAAGGGGAAAGAGGGTG	Chr4:8486255
QBFJS002	AAAGGGGAAAGAGGGTA	Chr4:8486255
QBFJS003	ATCATATGGCCGGGAGAC	Chr4:8486342
QBFJS004	ATCATATGGCCGGGAGAA	Chr4:8486342
QRJS001	AAATTCATAAACCCTCTTCAG	Chr4:8486412
QRJS002	AAATTCATAAACCCTCTTCAC	Chr4:8486412
QBRJS001	AATTCATAAACCCTCTTCAG	Chr4:8486412
QBRJS002	AATTCATAAACCCTCTTCAC	Chr4:8486412
400	CAAATTGTTGATGGGCAAC	Chr4:8486180
401	CACGTATATTCGAGGAGGTG	Chr4:8487119
418	CCAGATTCCGTGTAAGGCAG	Chr4:8486859
515	TGATGCTGTTGTGGGAGATCT	Chr4:8486798
516	TGATGCTGTTGTGGGAGATCC	Chr4:8486798